

学校编码: 10384

学号: 21720080150429

分类号__密级

UDC

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

A 型流感病毒 NS1 的构象变化与功能调节

Conformational switch and functional regulation in NS1A

protein from influenza A viruses

吴彩明

指导教师姓名: 林天伟 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 201 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

年

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):
年 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ☒ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☐ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	II
1 前言	1
1.1 流感病毒的研究概况.....	1
1.1.1 流感病毒的概述	1
1.1.2 流感病毒的结构	1
1.1.3 流感病毒的分类和命名	2
1.1.4 流感病毒的复制	3
1.1.5 流感病毒的特征	4
1.1.6 流感病毒的危害	5
1.1.7 抗流感病毒药物的研究进展	5
1.2 流感病毒非结构蛋白	7
1.2.1 非结构蛋白的结构研究	8
1.2.2 非结构蛋白的生理功能研究	14
1.3 蛋白结晶	20
1.3.1 蛋白质结晶原理	20
1.3.2 蛋白质结晶基本过程	21
1.3.3 结晶方法	21
1.3.4 蛋白结晶的影响因素	23
1.4 X 射线晶体学	24
1.4.1 X 射线晶体学的基本概念	25
1.4.2 分子置换法	26
1.5 荧光淬灭	28
1.5.1 基本定义	28
1.5.2 蛋白质的荧光淬灭	28
1.5.3 Stern-Volmer	28

1.6	光散射	29
1.7	圆二色谱	30
1.8	本课题的研究目的及意义	31
2	NS1A RBD 的结构研究	33
2.1	研究背景	33
2.2	材料	33
2.2.1	质粒和菌株	33
2.2.2	常用试剂	33
2.2.3	主要仪器	34
2.3	RBD 晶体结构的研究	34
2.3.1	RBD 表达质粒的构建	34
2.3.2	目的蛋白的表达	38
2.3.3	目的蛋白的纯化	39
2.3.4	结晶条件的初筛	41
2.3.5	结果与分析	41
2.4	讨论	48
3	NS1A 全长的晶体结构研究	52
3.1	研究背景	52
3.2	材料	52
3.2.1	质粒和菌株	52
3.2.2	常用试剂	52
3.2.3	主要仪器	52
3.3	磷酸化 NS1A 全长晶体结构	52
3.3.1	磷酸化 NS1A 基因的克隆	53
3.3.2	磷酸化 NS1A 的表达与纯化	55
3.3.3	磷酸化 NS1A 的结晶	59
3.3.4	磷酸化 NS1A 晶体结构解析	61

3.3.5	讨论	64
3.4	野生型 NS1A 全长晶体结构.....	66
3.4.1	野生型 NS1A 基因的克隆	66
3.4.2	野生型 NS1A 的表达和纯化	67
3.4.3	野生型 NS1A 的结晶	69
3.4.4	野生型 NS1A 晶体结构解析	70
3.4.5	讨论	72
3.5	NS1A (T215E) 与 β-iSH2 复合物的晶体结构.....	72
3.5.1	NS1A (T215E) 与 β -iSH2 基因的克隆.....	73
3.5.2	NS1A (T215E) 与 β -iSH2 蛋白的表达与纯化.....	73
3.5.3	NS1A (T215E) 与 β -iSH2 复合物的结晶.....	75
3.5.4	NS1A (T215E) 与 β -iSH2 复合物晶体的结构解析.....	76
3.5.5	讨论	78
4	NS1A 在溶液中的构象研究.....	81
4.1	研究背景	81
4.2	材料	81
4.2.1	质粒和菌株	81
4.2.2	常用试剂	81
4.2.3	主要仪器	81
4.3	NS1A 在溶液中的大小	82
4.3.1	分子筛法	82
4.3.2	静态光散射	84
4.4	NS1A 在溶液中的构象研究.....	85
4.4.1	Domain swapping	85
4.4.2	动态光散射	87
4.4.3	荧光淬灭	88
4.4.4	pH 值对 NS1A 构象的影响	99
4.4.5	dsRNA 对 NS1A 构象的影响	102

4.4.6 动静态淬灭的鉴定	107
4.5 讨论	109
4.6 总结	111
参考文献	113
附录 缩略词	126
致 谢	128

CONTENTS

ABSTRACT in Chinese.....	I
ABSTRACT in English.....	II
1 Introduction.....	1
1.1 The summary of study in influenza viruses	1
1.1.1 The introduction of influenza viruses	1
1.1.2 The structure of influenza viruses	1
1.1.3 The classification and nomenclature of influenza viruses.....	2
1.1.4 The replication of influenza viruses	3
1.1.5 The characteristic of influenza viruses	4
1.1.6 The threat of influenza viruses	5
1.1.7 The progress of antiviral agents.....	5
1.2 The nonstructural protein of influenza viruses	7
1.2.1 The structural study of nonstructural protein.....	8
1.2.2 The functional study of nonstructural protein	14
1.3 The crystallization of protein	20
1.3.1 The principle of crystallization.....	20
1.3.2 The basic process of crystallization	21
1.3.3 The method of crystallization	21
1.3.4 The influence factor of crystallization	23
1.4 X-ray crystallography	24
1.4.1 The fundamental concepts of x-ray crystallography	25
1.4.2 Molecular replacement	26
1.5 Fluorescence quenching.....	28
1.5.1 The fundamental definition	28
1.5.2 The fluorescence quenching of protein	28
1.5.3 Stern-Volmer	28
1.6 The light scattering.....	29
1.7 Circular dichroism	30
1.8 The purpose and significance of the reserach.....	31

2 The structural study of NS1A RBD	33
2.1 The background.....	33
2.2 The materials	33
2.2.1 Plasmids and strains.....	33
2.2.2 Common reagents.....	33
2.2.3 Key instruments.....	34
2.3 The structural study of RBD	34
2.3.1 The construction of expression plasmid	34
2.3.2 The expression of objective protein.....	38
2.3.3 The purification of objective protein	39
2.3.4 The initial screen of crystallization condition	41
2.3.5 The result and analysis	41
2.4 Discussion	48
3 The structural study of full-length NS1A.....	52
3.1 The background.....	52
3.2 The materials	52
3.2.1 Plasmids and strains.....	52
3.2.2 Common reagents.....	52
3.2.3 Key instruments	52
3.3 The structure of phosphorylated NS1A.....	52
3.3.1 Cloning of phosphorylated NS1A	53
3.3.2 The expression and purification of phosphorylated NS1A	55
3.3.3 The crystallization of phosphorylated NS1A	59
3.3.4 The resolution of crystal structure of phosphorylated NS1A	61
3.3.5 Discussion.....	64
3.4 The structure of native NS1A.....	66
3.4.1 Cloning of native NS1A	66
3.4.2 The expression and purification of native NS1A	67
3.4.3 The crystallization of native NS1A	69
3.4.4 The resolution of crystal structure of native NS1A	70
3.4.5 Discussion.....	72

3.5	The complex structure of NS1A(T215E) and β-iSH2.....	72
3.5.1	Cloning of NS1A(T215E) and β -iSH2	73
3.5.2	The expression and purification of NS1A(T215E) and β -iSH2	73
3.5.3	The crystallization of NS1A(T215E) and β -iSH2	75
3.5.4	The resolution of crystal structure of NS1A(T215E) and β -iSH2	76
3.5.5	Discussion.....	78
4	The conformational study of NS1A in solution	81
4.1	The background.....	81
4.2	The materials	81
4.2.1	Plasmids and strains.....	81
4.2.2	Common reagents	81
4.2.3	Key instruments	81
4.3	The molecular weight of NS1A in solution	82
4.3.1	The gel filtration	82
4.3.2	The static light scattering.....	84
4.4	The conformation of NS1A in solution	85
4.4.1	Domain swapping	85
4.4.2	The dynamic light scattering	87
4.4.3	The fluorescence quenching.....	88
4.4.4	The pH effect of NS1A conformation	99
4.4.5	The dsRNA effect of NS1A conformation.....	102
4.4.6	The identify of danamic or static fluorescence quenching.....	107
4.5	Discussion	109
4.6	Conclusion.....	111
	References.....	113
	Appendix.....	126
	Acknowledgement.....	128

摘 要

A 型流感病毒是一类重要的、具有高度传染性的病原体。它引发了每一年的季节性流感，造成了 1918 年、1957 年、1968 年和 2009 年的流感大爆发。此外，有些 H5N1 流感病毒株具有跨种族传播和可能引起类似 1918 年大规模流感的能力，加大了潜在的危险性。A 型流感病毒非结构蛋白（NS1A）是一个关键的毒力因子，在病毒繁殖周期中起着至关重要的作用。它通过拮抗干扰素 α/β 调节宿主细胞抗病毒状态，利用细胞的机制进行自身 RNA 加工、蛋白合成和颗粒的形成，以及抑制宿主的免疫机制和凋亡反应等发挥作用。

NS1A 通常分为两个结构域，一个是 RNA 结合区（RBD），另一个是受体蛋白结合区（ED）。ED 和许多宿主因子有相互作用，而 RBD 的主要作用是结合病毒的 dsRNA，同时也能结合其它因子。RBD、ED 以及它们各自的复合物晶体已经得到解析，但是由于缺乏全长结构的信息使得 RBD 和 ED 之间的关系仍然无法确定。先前解析得到的全长结构只能用于详细说明 dsRNA 的隔离，但也留下许多未曾解决的问题，如：RBD 和 ED 之间的关系、RBD 结合 dsRNA 的本质和后果。这些问题只能通过解析有生物学功能的全长结构来回答。

我们解析了野生型和 3 个根据生理功能进行突变的 A/PR/8/34 (H1N1) NS1A 全长结构。它首次描述了 RBD 和 ED 之间存在的功能关系。结合结晶学、生化分析和荧光光谱学进行实验，我们阐明了 NS1A 在溶液中的构象，同时也展示了相应的生物学功能。

关键词：非结构蛋白 1；晶体结构；水溶液构象

ABSTRACT

Influenza A viruses (IAV) is a significant and highly infectious pathogen to humans. It causes the annual flu season and associated with the pandemics of 1918, 1957, 1968, and 2009. In addition, it looms large with its capacity for cross-species transmission and potential to cause a 1918-like pandemic by strains such as H5N1 viruses. NS1 protein of IAV (NS1A) is a critical factor in the pathogenesis of the viruses and plays vital roles in the viral life cycle through its antagonism to the interferon- α/β mediated antiviral activities of the host, usurp of cellular machinery for its viral RNA processing, protein synthesis and particle morphogenesis, and suppression of host's immune and apoptotic responses, among others.

NS1A is notionally divided into two domains, an RNA binding domain (RBD) and an effector domain (ED). ED has been linked to multiple interactions with various factors, while a characteristic function of RBD is correlated to the binding of viral dsRNA, as well as other host factors. Several structures of RBD and ED, and their complexes with interacting partners, have been investigated, yet the relationship between RBD and ED is still mostly under-characterized with a glaring lack of structural information on the full-length structure. A previous structural study of the full-length NS1A structure expounded the sequestration of dsRNA but addressed little of issues beyond, which leaves many questions open, such as the relationship between RBD and ED and the nature and consequence of RBD interaction with dsRNA. These issues could be addressed through the characterization of biologically relevant full-length NS1A structures.

We undertake the structure determination of the full-length NS1A structures of the native protein and 3 biologically relevant mutants from the prototypic A/PR/8/34 H1N1 viruses. It first delineates the functional relationship between the RBD and ED. By a combination of X-ray crystallography, biochemical analysis, and fluorescence spectroscopy, the structure and conformations of the protein in solution are elucidated and its biological implications are demonstrated.

Key Words: Nonstructural protein 1; crystal structure; conformation in solution.

1前言

1.1 流感病毒的研究概况

2009 年 4 月开始，墨西哥、美国等国相继发生了人感染“猪流感”（即新型甲型 H1N1）的事件^[1, 2]。此后，疫情迅速蔓延到世界各地，引起人们极大的恐慌。世界卫生组织于 6 月 12 日宣布将此次流感大流行警告升至六级，而第六级是最高警戒级别，意味着甲型 H1N1 流感全球大暴发^[3]。由于流感病毒的致病性与多变性以及发生人传人的可能性^[4]，使得流感病毒的研究，备受各国高度关注。

1.1.1 流感病毒的概述

流感病毒（Influenza viruses），属于正粘病毒科（Orthomyxoviridae），它的基因组是由 8 段长短不一的单链 RNA 片段组成^[5]，每个节段编码 1-2 个蛋白。流感病毒具有极强的传染性，能够感染人、猪、马及禽类等，引起上呼吸道感染，并借由空气迅速传播，在世界各地经常会有周期性的大流行^[6]。人流感病毒最早由 Smith, Andrewes 和 Laidlaw 于 1933 年从感染人流感病毒的雪貂中分离得到^[7]。

1.1.2 流感病毒的结构

流感病毒颗粒一般为球形^[5]，直径为 80-120nm，新分离的毒株则多呈丝状，长度可达 400nm。流感病毒颗粒由外膜、基质蛋白以及核衣壳三部分组成(图 1-1)。

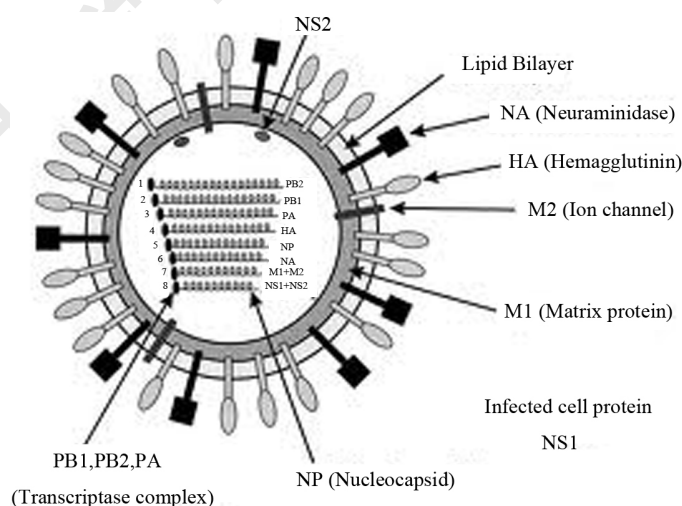


图 1-1 A 型流感病毒结构示意图

血凝素（HA）、神经氨酸酶（NA）和少量离子通道蛋白 M2 贯穿于病毒颗粒膜表面的磷脂双分

子层, 基质蛋白 (Matrix protein, M1) 位于磷脂双分子层的底部。病毒颗粒内部有 8 个单链 RNA, 它们所编码的蛋白如图所示。

Fig-1 A schematic diagram of the structure of the influenza A viruses.

Three types of integral membrane protein-hemagglutinin(HA),neuraminidase(NA) and small amounts of the M2 ion channel protein-are inserted through the lipid bilayer fo the viral membrane. The virion matrix protein(M1) is underline the lipid bilayer. Within the envelop are eight segments of single-stranded genome RNA, the coding assignments of the eight RNA segments are also illustrated.

资料来源: Lamb, R.A. and R.M. Krug. Orthomyxoviruses. 2001.

外膜由磷脂双分子和两种非常重要的糖蛋白, 即血凝素 (Hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 组成。这两种糖蛋白突出病毒体外, 长度约为 10 至 40nm, 又被称作刺突。一般一个流感病毒表面会分布有 500 个血凝素和 100 个神经氨酸酶。这些糖蛋白是流感病毒抗原结构的主要成分, 同时也是流感疫苗的重要组成部分^[8]。

基质蛋白 (Matrix protein, M1) 位于外膜的内部, 构成了病毒的外壳骨架。实际上骨架中除了基质蛋白(M1)之外还有膜蛋白(M2)。M2 蛋白具有离子(主要是 Na^+) 通道和调节膜内 PH 值的作用, 但数量很少^[9]。基质蛋白与病毒最外层的外膜紧密结合, 起到保护病毒核心和维系病毒空间结构的作用。

核衣壳的主要成分是核糖核蛋白 (RNP), 由 RNA 与核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 相结合形成。当流感病毒感染人体内后, 8 个 RNA 片段各司其职, 分别复制。第 1、2、3 个节段编码 RNA 多聚酶, 第 4 个节段编码血凝素 (HA); 第 5 个节段编码核蛋白 (NP), 第 6 个节段编码神经氨酸酶 (NA); 第 7 个节段编码基质蛋白 (M1 和 M2), 第 8 个节段编码非结构蛋白 (Nonstructural protein, NS1 和 NS2)。病毒的 RNA 多聚酶是由 Polymerase B2 (PB2), Polymerase B1 (PB1) 和 Polymerase A (PA) 组成, 负责病毒的复制和转录^[10]。

1.1.3 流感病毒的分类和命名

根据流感蛋白核蛋白的抗原性, 可将其分为三类^[5]: A 型流感病毒 (Influenza A viruses)、B 型流感病毒 (Influenza B viruses) 和 C 型流感病毒 (Influenza C viruses)。其中 A 型流感病毒感能够感染人、猪、马和禽类, 病毒抗原性易发生变异, 多次引

起世界大流行；B 型流感病毒仅感染人类，致病能力较低；C 型流感病毒主要感染人和猪，引起人类不明显的或轻微的上呼吸道感染，很少造成流行。根据流感病毒表面 16 种不同的血凝素（HA）（H1-16）和 9 种神经氨酸酶（NA）（N1-9）^[11]，又可将 A 型流感病毒分为不同的亚型，从理论上来说一共有 144 种亚型组合。同时，根据毒株致病性的不同，又可将其分为高致病力毒株、低致病力毒株和无致病力毒株。

60 年代后期大量的流感病毒被分离出来后，建立一个有意义的命名和分类系统迫在眉睫。世界卫生组织为解决这一问题，特别设立一个专家委员会对流感病毒进行分类和分级。委员会于 1971 年做了第一次报告，将流感病毒分为 A，B 和 C 三种类型。在 1979 年命名法曾做过修改，直到 1980 年世界卫生组织最终确定了流感病毒毒株命名法^[12]。流感毒株的命名包含 6 个要素：型别/宿主/分离地区/毒株序号/分离年份（HnNn）。通过这样的命名，我们对某株病毒有一个直观的认识。对于人流感病毒，命名的时候可以省略宿主信息；而对于 B 型和 C 型流感病毒，则可以省略亚型信息。以 A/swine/Lowa/15/30 (H1N1)为例，它告诉我们这株流感病毒的核蛋白属于 A 型，1930 年在 Iowa 分离到的以猪为宿主的 H1N1 亚型流感病毒，其毒株序号为 15。

1.1.4 流感病毒的复制

当流感病毒感染细胞后，病毒颗粒表面的 HA 与靶细胞表面的糖蛋白分子——唾液酸（Sialic acid, SA）结合,诱导细胞吞噬病毒^[13]。HA 与 SA 不同结合方式决定了流感病毒宿主特异性。如：人流感病毒的 HA 通过 $\alpha 2-6$ 糖苷键与唾液酸结合，而禽流感病毒的 HA 通过 $\alpha 2-3$ 糖苷键与唾液酸结合^[14]。经过内吞作用，病毒核糖核蛋白释放到细胞质中，随后转运到进行复制和转录的细胞核内。转录得到的 mRNA 输出到细胞质进行翻译，合成 RNA 多聚酶、核蛋白、基质蛋白、血凝素、神经氨酸酶、非结构蛋白等。基质蛋白、血凝素、神经氨酸酶等蛋白在内质网或高尔基体上组装成 M 蛋白和外膜。同时，病毒的遗传物质在细胞核内不断复制，并与核蛋白组成核糖核蛋白（RNP）。RNP 结合基质蛋白、外膜，组装成新的病毒颗粒。最后，病毒表面的 NA 将 HA 与宿主细胞 SA 相互作用的键断开,从而使病毒颗粒得以游离并继续侵入其它正常宿主细胞^[15]。整个流感病毒的复制周期大约 8 个小时(图 1-2)。

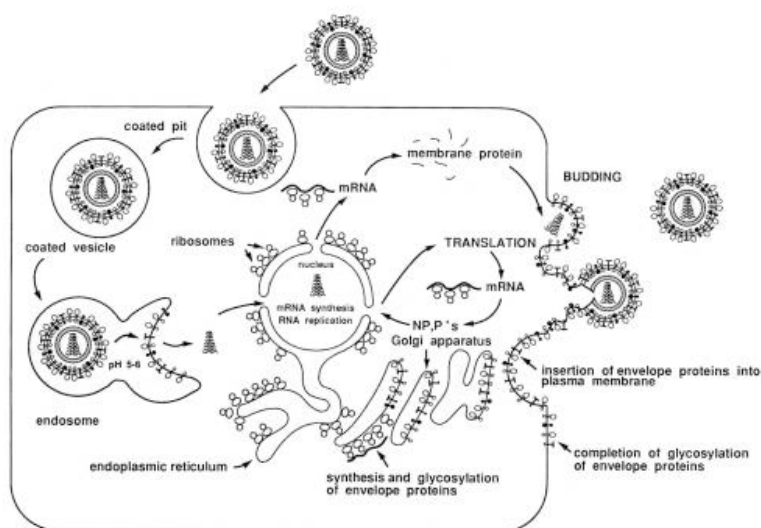


图 1-2 流感病毒复制周期

病毒的整个复制周期包括：（1）吸附作用；（2）内吞和融合；（3）mRNA 的合成和 RNA 的复制；（4）病毒基因的表达；（5）组装成新的病毒颗粒；（6）释放

Fig.1-2 Schematic diagram of the influenza viral life cycle.

The whole viral life cycle is including: (1) adsorption; (2) endocytosis and fusion; (3) mRNA synthesis and virion RNA replication; (4) viral gene expression; (5) packaging; (6) release.

资料来源：Lamb, R.A. and R.M. Krug. Orthomyxoviruses. 2001.

1.1.5 流感病毒的特征

流感病毒的基因组不断进化，逃脱宿主已获得的免疫^[16]。病毒 RNA 多聚酶缺乏“校正”功能易发生突变，基因在复制过程不断出现变异，因此流感病毒的抗原性多样化，导致每年可引起中、小型流行，但是至今仍无良好防治措施^[17]。

诱发流感病毒抗原多样性的方式有抗原漂移（Antigenic drift）和抗原转换（Antigenic shift）^[18, 19]。抗原漂移是HA或者NA自发的点突变引起小幅度的变异，积累到一定程度或正好使抗原决定簇发生改变。抗原转换，又称基因重组，主要是由于不同亚型甚至不同宿主的流感病毒感染相同细胞后，病毒基因组复制过程中交换了彼此的基因组片段而引起的。流感病毒基因组中变异率最高的是HA，其次是NA。流感病毒含有8个基因组片段。当一个宿主细胞同时感染2个或2个以上病毒时，不同病毒的基因组片段在增殖过程中可以随机重新组合，理论上就能产生出256种遗

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库